

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation⁶ : C12N 15/22, C07K 14/565, A61K 38/21	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/48018 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/02238 (22) Internationales Anmeldedatum: 16. April 1998 (16.04.98) (30) Prioritätsdaten: 197 17 864.2 23. April 1997 (23.04.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHNEIDER-FRESENIUS, Christian [DE/DE]; Rembrandtstrasse 5, D-30177 Hannover (DE). OTTO, Bernd [DE/DE]; Halberstadtweg 9, D-30659 Hannover (DE). WASCHÜTZ, Gero [DE/DE]; Höfen 8, D-38536 Meinersen (DE). (74) Anwalt: PFENNING, MEINIG & PARTNER GBR; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
(54) Title: RECOMBINANT HUMAN BETA INTERFERON WITH ENHANCED SOLUBILITY (54) Bezeichnung: HUMANES, REKOMBINANTES INTERFERON- β MIT VERBESSERTER LÖSLICHKEIT (57) Abstract The invention relates to variants of recombinant human beta interferon and to a method for the production thereof, wherein at least one of the following amino acids Leu(5), Phe(8), Phe(15), Leu(47), Phe(50), Leu(106), Phe(111), Leu(116), Leu(120) and Phe(156) are exchanged with hydrophilic amino acid with a hydroxy group, specially serine, tyrosine or threonine, resulting in enhanced hydrophilic property of the protein surface. <table style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-family: monospace;"> <tr> <td style="width: 10%;">Met</td><td style="width: 10%;">Ser</td><td style="width: 10%;">Tyr</td><td style="width: 10%;">Asn</td><td style="width: 10%;">Xaa</td><td style="width: 10%;">Leu</td><td style="width: 10%;">Gly</td><td style="width: 10%;">Xaa</td><td style="width: 10%;">Leu</td><td style="width: 10%;">Gln</td><td style="width: 10%;">Arg</td><td style="width: 10%;">Ser</td><td style="width: 10%;">Ser</td><td style="width: 10%;">Asn</td><td style="width: 10%;">Xaa</td><td style="width: 10%;">Gln</td></tr> <tr> <td>1</td><td></td><td></td><td></td><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>15</td><td></td></tr> <tr> <td></td><td>Cys</td><td>Gln</td><td>Lys</td><td></td><td>Leu</td><td>Leu</td><td>Trp</td><td>Gln</td><td>Leu</td><td>Asn</td><td>Gly</td><td>Arg</td><td>Leu</td><td>Glu</td><td>Tyr</td></tr> <tr> <td></td><td></td><td></td><td>20</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>25</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>30</td><td>Cys</td></tr> <tr> <td></td><td>Lys</td><td>Asp</td><td>Arg</td><td>Met</td><td>Asn</td><td>Phe</td><td>Asp</td><td>Ile</td><td>Pro</td><td>Glu</td><td>Glu</td><td>Ile</td><td>Lys</td><td>Gln</td><td>Xaa</td></tr> <tr> <td></td><td></td><td></td><td>35</td><td></td><td></td><td></td><td>40</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>45</td><td></td><td>Gln</td></tr> <tr> <td>Gln</td><td>Xaa</td><td>Gln</td><td>Lys</td><td>Glu</td><td>Asp</td><td>Ala</td><td>Ala</td><td>Leu</td><td>Thr</td><td>Ile</td><td>Tyr</td><td>Glu</td><td>Met</td><td>Leu</td><td>Gln</td></tr> <tr> <td>50</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>55</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>60</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr> <td>Asn</td><td>Ile</td><td>Phe</td><td>Ala</td><td>Ile</td><td>Phe</td><td>Arg</td><td>Gln</td><td>Asp</td><td>Ser</td><td>Ser</td><td>Ser</td><td>Thr</td><td>Gly</td><td>Trp</td><td>Asn</td></tr> <tr> <td>65</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>70</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>75</td><td></td><td></td><td></td><td>80</td><td></td></tr> <tr> <td>Glu</td><td>Thr</td><td>Ile</td><td>Val</td><td>Glu</td><td>Asn</td><td>Leu</td><td>Leu</td><td>Ala</td><td>Asn</td><td>Val</td><td>Tyr</td><td>His</td><td>Gln</td><td>Ile</td><td>Asn</td></tr> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td>85</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>90</td><td></td><td></td><td></td><td>95</td><td></td><td></td></tr> <tr> <td>His</td><td>Leu</td><td>Lys</td><td>Thr</td><td>Val</td><td>Leu</td><td>Glu</td><td>Glu</td><td>Lys</td><td>Xaa</td><td>Glu</td><td>Lys</td><td>Glu</td><td>Asp</td><td>Xaa</td><td>Thr</td></tr> <tr> <td></td><td></td><td></td><td>100</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>105</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>110</td><td></td><td></td></tr> <tr> <td>Arg</td><td>Gly</td><td>Lys</td><td>Xaa</td><td>Met</td><td>Ser</td><td>Ser</td><td>Xaa</td><td>His</td><td>Leu</td><td>Lys</td><td>Arg</td><td>Tyr</td><td>Tyr</td><td>Gly</td><td>Arg</td></tr> <tr> <td></td><td></td><td>115</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>120</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>125</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr> <td>Ile</td><td>Leu</td><td>His</td><td>Tyr</td><td>Leu</td><td>Lys</td><td>Ala</td><td>Lys</td><td>Glu</td><td>Tyr</td><td>Ser</td><td>His</td><td>Cys</td><td>Ala</td><td>Trp</td><td>Thr</td></tr> <tr> <td>130</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>135</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>140</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr> <td>Ile</td><td>Val</td><td>Arg</td><td>Val</td><td>Glu</td><td>Ile</td><td>Xaa</td><td>Arg</td><td>Asn</td><td>Phe</td><td>Tyr</td><td>Phe</td><td>Ile</td><td>Asn</td><td>Arg</td><td>Leu</td></tr> <tr> <td>145</td><td></td><td></td><td></td><td>150</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>155</td><td></td><td></td><td></td><td>160</td><td></td></tr> <tr> <td>Thr</td><td>Gly</td><td>Tyr</td><td>Leu</td><td>Arg</td><td>Asn</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td>165</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table>			Met	Ser	Tyr	Asn	Xaa	Leu	Gly	Xaa	Leu	Gln	Arg	Ser	Ser	Asn	Xaa	Gln	1				5					10					15			Cys	Gln	Lys		Leu	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Arg	Leu	Glu	Tyr				20						25					30	Cys		Lys	Asp	Arg	Met	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Lys	Gln	Xaa				35				40						45		Gln	Gln	Xaa	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Tyr	Glu	Met	Leu	Gln	50						55					60					Asn	Ile	Phe	Ala	Ile	Phe	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Trp	Asn	65					70					75				80		Glu	Thr	Ile	Val	Glu	Asn	Leu	Leu	Ala	Asn	Val	Tyr	His	Gln	Ile	Asn					85					90				95			His	Leu	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Glu	Lys	Xaa	Glu	Lys	Glu	Asp	Xaa	Thr				100					105					110			Arg	Gly	Lys	Xaa	Met	Ser	Ser	Xaa	His	Leu	Lys	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Arg			115					120					125				Ile	Leu	His	Tyr	Leu	Lys	Ala	Lys	Glu	Tyr	Ser	His	Cys	Ala	Trp	Thr	130					135						140					Ile	Val	Arg	Val	Glu	Ile	Xaa	Arg	Asn	Phe	Tyr	Phe	Ile	Asn	Arg	Leu	145				150						155				160		Thr	Gly	Tyr	Leu	Arg	Asn															165											
Met	Ser	Tyr	Asn	Xaa	Leu	Gly	Xaa	Leu	Gln	Arg	Ser	Ser	Asn	Xaa	Gln																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
1				5					10					15																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
	Cys	Gln	Lys		Leu	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Arg	Leu	Glu	Tyr																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
			20						25					30	Cys																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
	Lys	Asp	Arg	Met	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Lys	Gln	Xaa																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
			35				40						45		Gln																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
Gln	Xaa	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Tyr	Glu	Met	Leu	Gln																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
50						55					60																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
Asn	Ile	Phe	Ala	Ile	Phe	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Trp	Asn																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
65					70					75				80																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Glu	Thr	Ile	Val	Glu	Asn	Leu	Leu	Ala	Asn	Val	Tyr	His	Gln	Ile	Asn																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
				85					90				95																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
His	Leu	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Glu	Lys	Xaa	Glu	Lys	Glu	Asp	Xaa	Thr																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
			100					105					110																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
Arg	Gly	Lys	Xaa	Met	Ser	Ser	Xaa	His	Leu	Lys	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Arg																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
		115					120					125																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
Ile	Leu	His	Tyr	Leu	Lys	Ala	Lys	Glu	Tyr	Ser	His	Cys	Ala	Trp	Thr																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
130					135						140																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
Ile	Val	Arg	Val	Glu	Ile	Xaa	Arg	Asn	Phe	Tyr	Phe	Ile	Asn	Arg	Leu																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
145				150						155				160																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Thr	Gly	Tyr	Leu	Arg	Asn																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
				165																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
(57) Zusammenfassung Es werden Varianten des rekombinanten humanen Interferon-β sowie ein Verfahren zu seiner Herstellung vorgeschlagen, bei denen mindestens eine der folgenden Aminosäuren Leu(5), Phe(8), Phe(15), Leu(47), Phe(50), Leu(106), Phe(111), Leu(116), Leu(120) sowie Phe(156) gegen hydrophile Aminosäuren mit einer Hydroxygruppe, insbesondere Serin, Tyrosin oder Threonin, ausgetauscht sind, wodurch die Hydrophilität der Oberfläche des Proteins erhöht wird.																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Humanes, rekombinantes Interferon- β
mit verbesserter Löslichkeit

Die Erfindung betrifft Varianten des humanen, rekombinanten Interferon- β mit verbesserter Löslichkeit.

Interferon- β ist ein regulatorisches Protein, das durch Rezeptorbindung zur Aktivierung von Genen führt. Dadurch werden in der Zelle antivirale, antiproliferative sowie weitere biologische Aktivitäten vermittelt.

Interferone gehören, wie die Interleukine, zur Klasse der Cytokine und gliedern sich in unterschiedliche Klassen:

Interferon Typ I ($-\alpha, -\beta, -\omega, -\tau$) und Typ II ($-\gamma$)

Humanes Interferon- β ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 22 kDa und 166 Aminosäure-Resten. Es

wird hauptsächlich in Fibroblasten bei Virusbefall gebildet und besitzt antivirale, antiproliferative sowie weitere biologische Aktivitäten. Die Aminosäuresequenz des humanen Interferon- β wurde erstmals von Taniguchi et al. (1980), Gene Bd. 10, Seiten 11 bis 15, veröffentlicht und ist in Fig. 1 dargestellt.

Gentechnologisch erzeugtes Interferon- β aus Bakterien- oder Säugerzellen wird erfolgreich bei der Behandlung der Multiplen Sklerose eingesetzt, einer bislang unheilbaren Krankheit mit großem Patientenkollektiv. Als problematisch für die Produktion und Aufarbeitung des rekombinanten humanen Interferon- β erweist sich jedoch die sehr hohe Hydrophobizität des Proteins, die eine sehr schlechte Löslichkeit des rekombinanten humanen Interferon- β verursacht.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Varianten des rekombinanten humanen Interferon- β zur Verfügung zu stellen, deren Löslichkeit in polaren Medien wie beispielsweise wässrigen Flüssigkeiten verbessert ist. Weiterhin ist es Ziel dieser Erfindung, Herstellungsverfahren für und Möglichkeiten der Verwendung von Varianten des rekombinanten humanen Interferon- β mit erhöhter Löslichkeit in polaren Medien wie wässrigen Flüssigkeiten anzugeben.

Diese Aufgabe wird durch das rekombinante humane Interferon- β gemäß Anspruch 1, seine Verwendung gemäß Anspruch 5 sowie seine Herstellung gemäß Anspruch 6 oder 7 gelöst.

Gemäß Anspruch 1 wird in dem bekannten humanen Interferon- β mindestens eine der folgenden zehn hydrophoben Aminosäuren gegen eine hydrophile Aminosäure aus-

getauscht: Leu 5, Phe 8, Phe 15, Leu 47, Phe 50, Leu 106, Phe 111, Leu 116, Leu 120 oder Phe 156. Die Erfindung bezieht sich dabei auf die Einzelmutationen sowie alle möglichen Kombinationen dieser einzelnen Aminosäuren-Austausche.

Die genannten Aminosäuren liegen im wesentlichen an der Oberfläche des humanen Interferon- β und nehmen dort einen relativ großen Anteil der Oberfläche ein. Der Austausch dieser Aminosäuren führt daher zu einer überproportional großen Verbesserung des hydrophilen Charakters der Oberfläche des rekombinanten humanen Interferon- β und erhöht daher die Löslichkeit dieses Proteins in polaren Medien wie zum Beispiel wässrigen Flüssigkeiten. Das erfindungsgemäße rekombinante humane Interferon- β ist aufgrund seiner erhöhten Hydrophilie in der Produktion sowie in der Aufarbeitung zu einem Wirkstoff erheblich einfacher handzuhaben.

Die Produktion der erfindungsgemäßen Varianten des rekombinanten humanen Interferon- β erfolgt in allgemein bekannter, herkömmlicher Weise mit Hilfe von Mikroorganismen beispielsweise in einer mit dem Gen für eines der erfindungsgemäßen Proteine versehenen Escherichia coli - Kultur. Die Herstellung dieser gentechnisch veränderten Mikroorganismen erfolgt ebenfalls in allgemein bekannter Weise mit Hilfe klassischer gentechnischer Mutageneseverfahren zum Austausch der entsprechenden Aminosäuren gegen hydrophile Aminosäuren, auf deren Darstellung an dieser Stelle daher verzichtet wird.

Die erfindungsgemäßen Proteine finden Anwendung zur Herstellung von Arzneimitteln, beispielsweise gegen Multiple Sklerose, sowie als Feinchemikalie für In

vitro-Versuche oder für Interferonspiegelmessungen.
Die verbesserte Hydrophilität dieser Proteine vereinfacht dabei sowohl die Herstellung, den Transport, die Aufbewahrung als auch die Applikation als Arzneimittel oder Feinchemikalie.

Vorteilhafte Weiterbildungen der erfindungsgemäßen Proteine werden in den abhängigen Ansprüchen gegeben.

Besonders vorteilhaft ist der Austausch gegen die Aminosäuren Serin, Tyrosin und Threonin, die mit je einer Hydroxygruppe besonders hydrophil sind.

Serin eignet sich aufgrund seiner geringen Größe besonders für einen Austausch, da mit ihm besonders geringe sterische Änderungen des Proteins verbunden sind.

In Fig. 2 ist die Aminosäuresequenz des nativen rekombinanten humanen Interferon- β dargestellt, bei dem die obengenannten zehn Aminosäuren wahlweise gegen Serin ausgetauscht werden. Diese austauschbaren Aminosäuren sind als Xaa dargestellt. Werden diese Aminosäuren ausgetauscht, so wird die Hydrophilität der Oberfläche des rekombinanten humanen Interferon- β sehr stark verbessert, während lediglich geringe Beeinträchtigungen der Funktionalität und Wirksamkeit des humanen rekombinanten Interferon- β auftreten.

Eine besonders vorteilhafte Weiterbildung ist in Fig. 3 dargestellt, wobei hier sämtliche der obengenannten zehn Aminosäuren gegen Serin ausgetauscht wurden, so daß sich eine besonders starke Erhöhung der Hydrophilität der Oberfläche des rekombinanten humanen Interferon- β ergibt.

Im folgenden wird ein Beispiel für eine erfindungs-
gemäße Variante des humanen rekombinanten Inter-
feron- β gegeben:

5 Fig. 1 zeigt das native humane rekombinante
 Interferon- β ,

Fig. 2 zeigt die erfindungsgemäßen Varianten-
des rekombinanten humanen Interferon-
10 β ,

Fig. 3 zeigt ein erfindungsgemäßes rekombinantes humanes Interferon- β , und

Fig. 4 zeigt Primer für die Mutagenese für
die Herstellung erfindungsgemäßen In-
terferon-β.

Wie bereits oben beschrieben, ist in Fig. 1 das native humane rekombinante Interferon- β beschrieben, wie es bereits jetzt mit Hilfe der bekannten molekularbiologischen und biotechnischen Möglichkeiten hergestellt werden kann.

25 In Fig. 2 ist die Sequenz des nativen humanen rekombinanten Interferon- β dargestellt, wobei mit Xaa diejenigen Aminosäuren bezeichnet wurden, die gegen eine Aminosäure mit mindestens einer Hydroxygruppe, vor-
30 teilhafterweise gegen Serin, Tyrosin und/oder Threonin ausgetauscht werden können und dabei ein erfindungsgemäßes rekombinantes humanes Interferon- β ergeben, das eine erhöhte Oberflächenhydrophilität besitzt.

Beispielsweise wurden sämtliche zehn Einzelvarianten des Interferon- β , bei denen Leu (5), Phe (8), Phe (15), Leu (47), Phe (50), Leu (106), Phe (111), Leu (116), Leu (120) oder Phe (156) gegen Serin ausgetauscht wurde, hergestellt, wobei sich insbesondere die Varianten mit dem Austausch der Aminosäuren Leu (5), Phe (8), Leu (47), Phe (50), Leu (106), Phe (111), Leu (116), Leu (120) gegenüber dem nativen Interferon- β , sowie auch diese Varianten der Cys-17-Ser-Variante des humanen Interferon- β durch eine vergleichbare biologische Aktivität auszeichnen.

Fig. 3 zeigt ein Beispiel für ein humanes rekombinantes Interferon- β , bei dem die folgenden Aminosäuren gegen Serin ausgetauscht wurden:

Leu(5), Phe(8), Phe(15), Leu(47), Phe(50), Leu(106), Phe(111), Leu(116), Leu(120) sowie Phe(156). Bei dieser Variante des rekombinanten humanen Interferon- β ergibt sich eine besonders hohe Hydrophilität der Oberfläche des Proteins und damit eine besonders gute Löslichkeit in wässrigen Lösungen.

Beispielsweise zeigt auch die Mehrfachvariante mit Aminosäureaustauschen an den Positionen 47, 50, 106, 111, 116 und 120 eine dem in diesem Beispiel verwendeten Ausgangsprotein Interferon- β mit einem Cys17Ser-Austausch entsprechende Aktivität.

Die Herstellung von Organismen mit einem erfindungsgemäß veränderten Gen für humanes rekombinantes Interferon- β erfolgt mittels klassischer Mutagenese-Verfahren.

Die Mutagenese erfolgt mittels PCR (Polymerasekettenreaktion). Die Mutationen werden durch synthetische Oligonukleotide eingeführt. Als Templat dient Plasmid-DNA mit dem IFN- β -Gen. Bei der hier angewandten PCR-Methode wird das gesamte Plasmid vervielfältigt. Die Selektion der PCR-Fragmente erfolgt durch einen Restriktionsverdau des gesamten PCR-Ansatzes mit dem Enzym DpnI. Dieses Enzym erkennt nur methylierte Schnittstellen. Da in-vitro durch PCR erzeugte Fragmente unmethyliert sind, wird durch DpnI nur die Templat-DNA abgebaut. Im Erfolgsfall bleibt nach dem DpnI-Verdau ein Fragment von der Länge des linearisierten Templates übrig, das die Mutationen trägt. Die erzeugten PCR-Fragmente werden kloniert und sequenziert.

PCR-Ansatz (100 μ l):	Templat-DNA	10 μ g
	Primer	je 100 pmol
	Nukleotidmix	200 μ M je dNTP
	MgSO ₄	2-6 mM
	DNA-Polymerase	2,5 Units

PCR-Protokoll	Dauer	Temperatur
Schritt 1.	4 min	95°C
Schritt 2.	+Enzym	
Schritt 3.	45 sec	95°C
Schritt 4.	1 min	55°C
Schritt 5.	10 min	68°C
		goto 3. (11x)
Schritt 6.	10 min	68°C
Schritt 7.		4°C

Die PCR wurde auf einem Thermocycler PTC-200 (Fa MJ Research) durchgeführt.

Für jede PCR sind zwei Primer notwendig, ein "forward"- und ein "reverse"-Primer. Beide Primer schließen sich direkt aneinander an, binden aber an jeweils unterschiedlichen Strängen und mit entgegengesetzter Orientierung.

In Fig. 4 sind Primer dargestellt, die für die Mutagenese verwendet wurden, damit im Genprodukt, dem erfindungsgemäßen Interferon- β , die linksseitig benannte Aminosäure(n) gegen Serin ausgetauscht sind.

Die letzten beiden Primer enthalten als einzige "reverse"-Primer Mutationen. Eine PCR mit diesen Primern führt zusätzlich Mutationen ein, ohne die zuvor eingefügten Mutationen 5/8 bzw. 106/111 wieder aufzuheben. Wird das Wildtypgen als Templat genommen, lassen sich mit den "reverse"-Primern vier Mutationen auf einmal einführen (5-17 bzw. 106-120).

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der
angewandten Forschung e. V.
- (B) STRASSE: Leonrodstrasse 54
- (C) ORT: München
- (D) BUNDESLAND: Freistaat Bayern
- (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 80636

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Humanes rekombinantes
Interferon-beta mit verbesserter Löslichkeit

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 22

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 166 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
- (G) ZELLTYP: Fibroblast

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Met	Ser	Tyr	Asn	Leu	Leu	Gly	Phe	Leu	Gln	Arg	Ser	Ser	Asn	Phe	Gln	1	5	10	15
Cys	Gln	Lys	Leu	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Arg	Leu	Glu	Tyr	Cys	Leu	20	25	30	
Lys	Asp	Arg	Met	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	35	40	45	
Gln	Phe	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Tyr	Glu	Met	Leu	Gln	50	55	60	
Asn	Ile	Phe	Ala	Ile	Phe	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Trp	Asn	65	70	75	80
Glu	Thr	Ile	Val	Glu	Asn	Leu	Leu	Ala	Asn	Val	Tyr	His	Gln	Ile	Asn	85	90	95	
His	Leu	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Glu	Lys	Leu	Glu	Lys	Glu	Asp	Phe	Thr	100	105	110	
Arg	Gly	Lys	Leu	Met	Ser	Ser	Leu	His	Leu	Lys	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Arg	115	120	125	
Ile	Leu	His	Tyr	Leu	Lys	Ala	Lys	Glu	Tyr	Ser	His	Cys	Ala	Trp	Thr	130	135	140	
Ile	Val	Arg	Val	Glu	Ile	Leu	Arg	Asn	Phe	Tyr	Phe	Ile	Asn	Arg	Leu	145	150	155	160
Thr	Gly	Tyr	Leu	Arg	Asn	165													

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 166 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
 - (G) ZELLTYP: Fibroblast
- (ix) MERKMALE:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
 - (B) LÄNGE: 5
 - (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Leu, Ser, Tyr oder Thr
- (ix) MERKMALE:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
 - (B) LÄNGE: 8
 - (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Phe, Ser, Tyr oder Thr
- (ix) MERKMALE:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
 - (B) LÄNGE: 15
 - (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Phe, Ser, Tyr oder Thr
- (ix) MERKMALE:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
 - (B) LÄNGE: 47
 - (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Leu, Ser, Tyr oder Thr
- (ix) MERKMALE:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
 - (B) LÄNGE: 50
 - (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Phe, Ser, Tyr oder Thr
- (ix) MERKMALE:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
 - (B) LÄNGE: 106
 - (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Leu, Ser, Tyr oder Thr
- (ix) MERKMALE:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
 - (B) LÄNGE: 111
 - (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Phe, Ser, Tyr oder Thr
- (ix) MERKMALE:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
 - (B) LÄNGE: 116
 - (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Leu, Ser, Tyr oder Thr

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal

(B) LAGE: 120

(C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Leu, Ser, Tyr oder Thr

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal

(B) LAGE: 151

(C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Leu, Ser, Tyr oder Thr

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met	Ser	Tyr	Asn	Xaa	Leu	Gly	Xaa	Leu	Gln	Arg	Ser	Ser	Asn	Xaa	Gln	1	5	10	15
Cys	Gln	Lys	Leu	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Arg	Leu	Glu	Tyr	Cys	Leu	20	25	30	
Lys	Asp	Arg	Met	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Lys	Gln	Xaa	Gln	35	40	45	
Gln	Xaa	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Tyr	Glu	Met	Leu	Gln	50	55	60	
Asn	Ile	Phe	Ala	Ile	Phe	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Trp	Asn	65	70	75	80
Glu	Thr	Ile	Val	Glu	Asn	Leu	Leu	Ala	Asn	Val	Tyr	His	Gln	Ile	Asn	85	90	95	
His	Leu	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Glu	Lys	Xaa	Glu	Lys	Glu	Asp	Xaa	Thr	100	105	110	
Arg	Gly	Lys	Xaa	Met	Ser	Ser	Xaa	His	Leu	Lys	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Arg	115	120	125	
Ile	Leu	His	Tyr	Leu	Lys	Ala	Lys	Glu	Tyr	Ser	His	Cys	Ala	Trp	Thr	130	135	140	
Ile	Val	Arg	Val	Glu	Ile	Xaa	Arg	Asn	Phe	Tyr	Phe	Ile	Asn	Arg	Leu	145	150	155	160
Thr	Gly	Tyr	Leu	Arg	Asn	165													

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 166 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(G) ZELLTYP: Fibroblast

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Met	Ser	Tyr	Asn	Ser	Leu	Gly	Ser	Leu	Gln	Arg	Ser	Ser	Asn	Ser	Gln	1	5	10	15
Cys	Gln	Lys	Leu	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Arg	Leu	Glu	Tyr	Cys	Leu	20	25	30	
Lys	Asp	Arg	Met	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Lys	Gln	Ser	Gln	35	40	45	
Gln	Ser	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Tyr	Glu	Met	Leu	Gln	50	55	60	
Asn	Ile	Phe	Ala	Ile	Phe	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Trp	Asn	65	70	75	80
Glu	Thr	Ile	Val	Glu	Asn	Leu	Leu	Ala	Asn	Val	Tyr	His	Gln	Ile	Asn	85	90	95	
His	Leu	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Glu	Lys	Ser	Glu	Lys	Glu	Asp	Ser	Thr	100	105	110	
Arg	Gly	Lys	Ser	Met	Ser	Ser	Ser	His	Leu	Lys	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Arg	115	120	125	
Ile	Leu	His	Tyr	Leu	Lys	Ala	Lys	Glu	Tyr	Ser	His	Cys	Ala	Trp	Thr	130	135	140	
Ile	Val	Arg	Val	Glu	Ile	Leu	Arg	Asn	Phe	Tyr	Ser	Ile	Asn	Arg	Leu	145	150	155	160
Thr	Gly	Tyr	Leu	Arg	Asn	165													

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:4:

C TCC CTT GGA TTC CTA CAA AGA AGC

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:5:

C TTG CTT GGA TCC CTA CAA AGA AGC

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:6:

AGC AGC AAT TCT CAG TCC CAG AAG CTC C

28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:7:

AGC AGC AAT TTT CAG TCC CAG AAG CTC C

28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:8:

TT AAG CAG TCC CAG CAG TTC CAG AAG G

27

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: Linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:9:

TT AAG CAG CTG CAG CAG TCC CAG AAG G

27

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: Linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:10:

GAA GAA AAA TCC GAG AAA GAA GAT TTC ACC

30

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: Linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:11:

GAA GAA AAA CTG GAG AAA GAA GAT TCC ACC

30

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: Linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:12:

A AAA TCC ATG AGC AGT CTG CAC CTG

25

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: Linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:13:

A AAA CTC ATG AGC AGT TCC CAC CTG

25

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: Linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:14:

AC TTT TAC TCC ATT AAC AGA CTT ACA GG

28

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: Linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:15:

TT GTA GCT CAT ATG TAA GTA TTT CC

25

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: Linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:16:

TCT TTG TAG GAA TCC AAG CAA GTT GTA GC

29

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: Linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:17:

T CTC CTC AGG GAT GTC AAA GTT CAT CC

27

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: Linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:18:

CAG GAC TGT CTT CAG ATG GTT TAT CTG

27

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: Linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:19:

CC CCT GGT GAA ATC TTC TTT CTC 23

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: Linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:20:

f TCT TAG GAT TTC CAC TCT GAC TAT GG 27

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: Linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:21:

TCT TTG TAG GGA TCC AAG GGA GTT GTA GC 29

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: Linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:22:

CC CCT GGT GGA ATC TTC TTT CTC GGA 26

Patentansprüche

1. Humanes, rekombinantes Interferon- β ,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß mindestens eine der Aminosäuren Leu(5),
Phe(8), Phe(15), Leu(47), Phe(50), Leu(106),
Phe(111), Leu(116), Leu(120), Phe(156) gegen
Aminosäuren mit mindestens einer Hydroxy-Gruppe
ausgetauscht ist.
10
2. Interferon- β nach Anspruch 1, dadurch gekenn-
zeichnet, daß die Aminosäuren mit Hydroxygruppen
Serin, Tyrosin und/oder Threonin sind.
- 15 3. Interferon- β nach mindestens einem der vorherge-
henden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es
folgende Aminosäuresequenz enthält:

	Met	Ser	Tyr	Asn	Xaa	Leu	Gly	Xaa	Leu	Gln	Arg	Ser	Ser	Asn	Xaa	Gln	
	1				5					10					15		
5	Cys	Gln	Lys	Leu	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Arg	Leu	Glu	Tyr	Cys	Leu	
				20				25						30			
	Lys	Asp	Arg	Met	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Lys	Gln	Xaa	Gln	
			35					40					45				
10	Gln	Xaa	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Tyr	Glu	Met	Leu	Gln	
		50					55					60					
	Asn	Ile	Phe	Ala	Ile	Phe	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Trp	Asn	
15	65					70				75					80		
	Glu	Thr	Ile	Val	Glu	Asn	Leu	Leu	Ala	Asn	Val	Tyr	His	Gln	Ile	Asn	
				85					90					95			
	His	Leu	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Glu	Lys	Xaa	Glu	Lys	Glu	Asp	Xaa	Thr	
20				100					105					110			
	Arg	Gly	Lys	Xaa	Met	Ser	Ser	Xaa	His	Leu	Lys	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Arg	
			115					120					125				
25	Ile	Leu	His	Tyr	Leu	Lys	Ala	Lys	Glu	Tyr	Ser	His	Cys	Ala	Trp	Thr	
		130				135						140					
	Ile	Val	Arg	Val	Glu	Ile	Leu	Arg	Asn	Phe	Tyr	Xaa	Ile	Asn	Arg	Leu	
30	145				150					155				160			
	Thr	Gly	Tyr	Leu	Arg	Asn											
						165											

wobei zumindest eine oder mehrere der Aminosäuren
 35 Xaa(5), Xaa(8), Xaa(15), Xaa(47), Xaa(50), Xaa(106),
 Xaa(111), Xaa(116), Xaa(120), Xaa(156), Serin, Tyro-
 sin oder Theronin sind und für die anderen Aminosäu-
 ren gilt
 Xaa(5) ist Leu, Xaa(8) ist Phe,
 40 Xaa(15) ist Phe, Xaa(47) ist Leu,

Xaa(50) ist Phe, Xaa(106) ist Leu,
Xaa(111) ist Phe, Xaa(116) ist Leu,
Xaa(120) ist Leu, Xaa(156) ist Phe.

- 5 4. Interferon- β nach mindestens einem der vorher-
gehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß
es die folgende Aminosäuresequenz enthält:

10	Met Ser Tyr Asn Ser Leu Gly Ser Leu Gln Arg Ser Ser Asn Ser Gln	1	5	10	15
	Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu	20	25	30	
15	Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Ser Gln	35	40	45	
	Gln Ser Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln	50	55	60	
20	Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn	65	70	75	80
	Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn	85	90	95	
25	His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Ser Glu Lys Glu Asp Ser Thr	100	105	110	
	Arg Gly Lys Ser Met Ser Ser Ser His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg	115	120	125	
30	Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr	130	135	140	
	Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Ser Ile Asn Arg Leu	145	150	155	160
35	Thr Gly Tyr Leu Arg Asn	165			
40					

5. Verwendung von Interferon- β nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung eines Arzneimittels, als Feinchemikalie für in-vitro-Versuche oder für Interferonspiegelmessungen.
5
6. Herstellungsverfahren für ein humanes, rekombinantes Interferon- β nach Anspruch 1 unter Verwendung eines Mikroorganismus, der das Gen für rekombinantes humanes Interferon- β enthält,
10 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß in ansonsten bekannter Weise in dem Gen für humanes, rekombinantes Interferon- β des Organismus der genetische Code für mindestens eine der
15 Aminosäuren Leu(5), Phe(8), Phe(15), Leu(47), Phe(50), Leu(106), Phe(111), Leu(116), Leu(120), Phe(156) gegen einen genetischen Code für Aminosäuren mit mindestens einer Hydroxygruppe, vorzugsweise Serin, Tyrosin oder Threonin, ausgetauscht wird.
20
7. Herstellungsverfahren für ein humanes, rekombinantes Interferon- β nach Anspruch 1 unter Verwendung eines Mikroorganismus,
25 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß in ansonsten bekannter Weise in das genetische Material des Mikroorganismus das Gen für humanes, rekombinantes Interferon- β eingefügt wird, wobei der genetische Code für mindestens
30 eine der Aminosäuren Leu(5), Phe(8), Phe(15), Leu(47), Phe(50), Leu(106), Phe(111), Leu(116), Leu(120), Phe(156) des eingefügten Gens gegen einen genetischen Code für Aminosäuren mit mindestens einer Hydroxygruppe, vorzugsweise Serin,
35 Tyrosin oder Threonin, ausgetauscht ist.

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1 5 10 15
Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
20 25 30
Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
35 40 45
Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
50 55 60
Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65 70 75 80
Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
85 90 95
His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
100 105 110
Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115 120 125
Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130 135 140
Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145 150 155 160
Thr-Gly Tyr Leu Arg Asn
165

Fig. 1

Met	Ser	Tyr	Asn	Xaa	Leu	Gly	Xaa	Leu	Gln	Arg	Ser	Ser	Asn	Xaa	Gln	1	5	10	15
Cys	Gln	Lys	Leu	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Arg	Leu	Glu	Tyr	Cys	Leu	20	25	30	
Lys	Asp	Arg	Met	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Lys	Gln	Xaa	Gln	35	40	45	
Gln	Xaa	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Tyr	Glu	Met	Leu	Gln	50	55	60	
Asn	Ile	Phe	Ala	Ile	Phe	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Trp	Asn	65	70	75	80
Glu	Thr	Ile	Val	Glu	Asn	Leu	Leu	Ala	Asn	Val	Tyr	His	Gln	Ile	Asn	85	90	95	
His	Leu	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Glu	Lys	Xaa	Glu	Lys	Glu	Asp	Xaa	Thr	100	105	110	
Arg	Gly	Lys	Xaa	Met	Ser	Ser	Xaa	His	Leu	Lys	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Arg	115	120	125	
Ile	Leu	His	Tyr	Leu	Lys	Ala	Lys	Glu	Tyr	Ser	His	Cys	Ala	Trp	Thr	130	135	140	
Ile	Val	Arg	Val	Glu	Ile	Xaa	Arg	Asn	Phe	Tyr	Phe	Ile	Asn	Arg	Leu	145	150	155	160
Thr	Gly	Tyr	Leu	Arg	Asn	165													

Fig. 2

Met	Ser	Tyr	Asn	Ser	Leu	Gly	Ser	Leu	Gln	Arg	Ser	Ser	Asn	Ser	Gln	1	5	10	15
Cys	Gln	Lys	Leu	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Arg	Leu	Glu	Tyr	Cys	Leu	20	25	30	
Lys	Asp	Arg	Met	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Lys	Gln	Ser	Gln	35	40	45	
Gln	Ser	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Tyr	Glu	Met	Leu	Gln	50	55	60	
Asn	Ile	Phe	Ala	Ile	Phe	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Trp	Asn	65	70	75	80
Glu	Thr	Ile	Val	Glu	Asn	Leu	Leu	Ala	Asn	Val	Tyr	His	Gln	Ile	Asn	85	90	95	
His	Leu	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Glu	Lys	Ser	Glu	Lys	Glu	Asp	Ser	Thr	100	105	110	
Arg	Gly	Lys	Ser	Met	Ser	Ser	Ser	His	Leu	Lys	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Arg	115	120	125	
Ile	Leu	His	Tyr	Leu	Lys	Ala	Lys	Glu	Tyr	Ser	His	Cys	Ala	Trp	Thr	130	135	140	
Ile	Val	Arg	Val	Glu	Ile	Leu	Arg	Asn	Phe	Tyr	Ser	Ile	Asn	Arg	Leu	145	150	155	160
Thr	Gly	Tyr	Leu	Arg	Asn	165													

Fig. 3

L5	5'-CT <u>CC</u> CTTGGATTCCCTACAAAGAAGC-3'	25
F8	5'-CTTGCTTGGAT <u>C</u> CTACAAAGAAGC-3'	25
F15/C17	5'-AGCAGCAATTCTCAGT <u>CC</u> CAGAAGCTCC-3'	28
C17	5'-AGCAGCAATTTTTCAGT <u>CC</u> CAGAAGCTCC-3'	28
L47	5'-TTAAGCAGT <u>CC</u> CAGCAGTTCCAGAAGG-3'	27
F50	5'-TTAAGCAGCTGCAGCAGT <u>C</u> CCAGAAGG-3'	27
L106	5'-GAAGAAAAAT <u>CC</u> GAGAAAGAAGATTTACACC-3'	30
F111	5'-GAAGAAAACTGGAGAAAGAAGATT <u>C</u> CACC-3'	30
L116	5'-AAAAT <u>C</u> CATGAGCAGTCTGCACCTG-3'	25
L120	5'-AAAACATCAGCAGT <u>TCCC</u> CACCTG-3'	25
F156	5'-ACTTTTACT <u>C</u> CATTAACAGACTTACAGG-3'	28
L5/F3Rev	5'-TTGTAGCTCATATGTAAGTATTTCC-3'	25
F15/C17Rev	5'-TCTTTGTAGGAATCCAAGCAAGTTGTAGC-3'	29
L47/F50Rev	5'-TCTCCTCAGGGATGTCAAAGTTCATCC-3'	27
L106/F111Rev	5'-CAGGACTGTCTTCAGATGGTTTATCTG-3'	27
L116/L120Rev	5'-CCCCTGGTGAAATCTTCTTTCTC-3'	23
F156Rev	5'-TTCTTAGGATTTCCACTCTGACTATGG-3'	27
L5-C17Rev	5'-TCTTTGTAGGGATCCAAGGAGTTGTAGC-3'	29
L106-L120Rev	5'-CCCCTGGTGGAATCTTCTTTCTCGGA-3'	26

Fig. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No

PCT/EP 98/02238

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/22 C07K14/565 A61K38/21

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 163 993 A (G.D. SEARLE & CO., LTD.) 11 December 1985 see page 9, line 8 - line 10 see page 16, line 8 see page 37 -----	1

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 July 1998

Date of mailing of the international search report

07/08/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Cornec, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/02238

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 163993 A	11-12-1985	AU 589560 B	19-10-1989
		AU 4256185 A	28-11-1985
		JP 61056200 A	20-03-1986
		US 4914033 A	03-04-1990
		US 4769233 A	06-09-1988

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02238

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/22 C07K14/565 A61K38/21

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ¹	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
A	EP 0 163 993 A (G.D. SEARLE & CO., LTD.) 11. Dezember 1985 siehe Seite 9, Zeile 8 - Zeile 10 siehe Seite 16, Zeile 8 siehe Seite 37 -----	1

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

¹ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"S" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. Juli 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

07/08/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Le Cornec, N

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02238

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 163993 A	11-12-1985	AU 589560 B	19-10-1989
		AU 4256185 A	28-11-1985
		JP 61056200 A	20-03-1986
		US 4914033 A	03-04-1990
		US 4769233 A	06-09-1988

THIS PAGE BLANK (USPTO)